

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

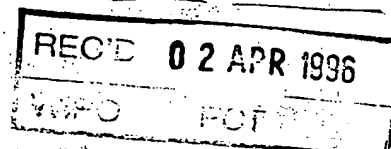
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PRIORITY DOCUMENT



bet
2-1899
#5/Prior
Doc

Bescheinigung

Die SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT in 13353 Berlin hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Verbindungen zur Detektion von Analyten mittels Remanenzmessung und deren Verwendung"

am 1. März 1995 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole G 01 N 33/53, G 01 N 33/58, C 12 Q 1/00 und G 01 R 33/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. November 1995

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Markus

Aktenzeichen: 195 08 772.0

Verfahren und Verbindung zur Detektion von Analyten mittels Remanenzmessung und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels Remanenzmessung, dafür geeignete Verbindungen und deren Verwendung in der Analytik.

Es ist bereits bekannt, daß quantitative Immunoassays sowie andere Bindungsassays (z.B. Rezeptorbindungsassays) es ermöglichen, eine sehr große Anzahl von Substanzen, die auch von biologischer Relevanz sein können, in Proben unterschiedlicher Zusammensetzung zu bestimmen. In der Regel wird hierbei jedoch nur ein Parameter pro Probe in einem Assay bestimmt. Eine aktuelle Übersicht der verschiedenen Verfahren gibt: T. Chard : An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques : Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 4. ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990). Grundlage aller Bindungsassays ist die hohe Nachweisempfindlichkeit isotonen- oder anders markierter Verbindungen mit der großen Spezifität von Ligand-Rezeptorreaktionen.

Die bekannten Verfahren haben jedoch folgende Nachteile:

1. Die Verfahren für die simultane Bestimmung verschiedener Analyten innerhalb derselben Probe basieren auf der unterschiedlichen radio-, fluoreszenz- oder enzymologischen Markierung der Sonden. Hierbei wird nach anschließender Separation und Wäsche die nichtgebundene bzw. gebundene Aktivität der Sonde für die quantitative Bestimmung des Analyten gemessen. Die Menge der einsetzbaren unterschiedlichen Sondenlabel ist dabei stark begrenzt. So treten zum Beispiel im Falle von unterschiedlichen Radioisotopen als Sondenmarkierung sogenannte Überlappungsphänomene auf, die zu einem rapiden Verlust der quantitativen Genauigkeit der individuellen Signale führen. Die Kombination verschiedener Enzyme als Sondenlabel verursacht vergleichbare Probleme, wobei hier zusätzlich die Suche nach Reaktionsbedingungen, die die simultane Bestimmung der Enzymreaktionen in einem System erlauben, erschwert wird.
2. Die Sensitivität der Verfahren ist zum Beispiel durch unspezifische Reaktionen der Matrix in der die Bestimmungen durchgeführt werden (Fluoreszenzeffekte der Matrix beim Fluoreszenzimmunoassay), begrenzt, oder

aber durch limitierte Markierungsmöglichkeit der Sonde (geringe spezifische Aktivität).

3. Die erfolgreiche Durchführung der Verfahren setzt eine Aufarbeitung des gewonnenen Probenmaterials (z. B. Herstellung von Serum bzw. Plasma aus Vollblut, Extraktion von Proben mit organischen Lösungsmitteln, Anreicherung des Analyten mittels chromatographischer Verfahren u.s.w.) voraus.

4. Für die erfolgreiche Durchführung der Verfahren sind Separations- und Waschschrte, die der Beseitigung von gebundenen und ungebundenen Rezeptoren bzw. Liganden dienen, unerlässlich.

5. Für die Durchführung von Radioimmunoassays ist der Einsatz teurer und in der Handhabung aufwendiger strahlender Nuklide erforderlich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein neuartiges kostengünstiges Verfahren und Substanzen zu entwickeln, die dem oben genannten Stand der Technik überlegen sind.

Es wird nun ein Verfahren beschrieben, das die Nachteile der bekannten Verfahren überwindet.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, ist dadurch gekennzeichnet, daß strukturspezifische Substanzen zunächst

i) mit freibeweglichen ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen geeigneter magnetischer Koerzitivfeldstärke und geeignetem magnetischem Moment markiert werden

und anschließend

ii) diese markierten strukturspezifischen Substanzen in einer zu vermessenden flüssigen oder immobilisierten Probe eingesetzt werden, die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der kolloidalen Teilchen mittels geeigneter Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei die durch spezifische Bindung auftretende Remanenz und deren Ausmaß zur Analyse herangezogen wird.

Als Suspensionsmedien kommen alle Flüssigkeiten in Betracht in denen die kolloidalen Partikel frei beweglich sind. Besonders geeignet sind Wasser, wässrige Lösungen oberflächenaktiver Hilfsstoffe, wie z.B. Tenside oder oligomere oder polymere Kohlenhydrate und Proteine, sowie Mischungen aus Wasser mit Alkoholen wie z.B. Glycerol und Polyethylenglykol. Es ist im allgemeinen vorteilhaft, Suspensionsmedien einer Viskosität, die kleiner als 100 mPas ist, zu verwenden. Die Suspensionsmedien können zusätzlich den osmotischen Druck verändernde Hilfsstoffe wie z.B. Kochsalz enthalten. Desweiteren können den pH-Wert bestimmende Puffersubstanzen, wie z.B. Phosphate, enthalten sein.

Die mit den ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Partikeln markierten strukturspezifischen Substanzen können auch in getrockneter Form, gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Hilfsstoffen, die z.B. die Trocknung erleichtern oder die Stabilität des getrockneten Produkts erhöhen, vorliegen (z. B. als Lyophilisate).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Verbindungen zur Detektion mittels Bindungsremanenzmessung in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umwelt und medizinischen Diagnostik.

Insbesondere wird mit den erfindungsgemäßen Verfahren durch die Verwendung von unterschiedlichen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen kolloidalen Substanzen mit ausreichend diskreten Koerzitivfeldstärken eine direkte simultane Bestimmung von mehreren verschiedenen Analyten in Flüssigkeiten oder Festsubstanzen ermöglicht.

Aufgrund des auf physikalischen Mechanismen beruhenden Bindungsnachweises können unspezifische Meßsignale (Matrixphänomene) weitgehend ausgeschlossen werden. Die Spezifität des Verfahrens hängt somit nur noch von der "wahren" Spezifität der strukturspezifischen Substanz (Kreuzreaktivität von Antikörpern, unspezifische Bindung von Liganden) ab. Aufgrund der hohen Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die sonst üblichen Detektionsgrenzen von Bindungsassays mühelos unterschritten.

Als geeignete kolloidale Partikel können in geeigneten Suspensionsmedien alle ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen verwendet werden, deren intrinsische Néel-Relaxationszeit größer als die Messzeit ist und die somit quasistabil sind. Besonders geeignet sind alle ferromagnetischen und

ferrimagnetischen Substanzen, deren Relaxationszeit länger als 10^{-3} Sekunden ist. Insbesondere geeignet sind alle ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen, deren Relaxationszeit länger als 1 Sekunde ist. Für die Durchführung von Messungen ohne Separations- oder Waschschrte muß die Viskosität des verwendeten Suspensionsmediums mit der Néel-Relaxationszeit der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Partikeln und der Messzeit abgestimmt werden, da das Suspensionsmedium wesentlich die Zeitkonstante der Brownschen Relaxation bestimmt. Andernfalls kann z.B. bei Verwendung von Partikeln mit kurzer Relaxationszeit (z.B. 0,01 Sekunden) in hochviskosen Suspensionsmedien (z.B. 80% Glycerol) und kurzer Messzeit (z.B. 0,0001 Sekunden nach Abschalten des äußeren Feldes) die Brownsche Relaxation (extrinsischer Superparamagnetismus) derart verlangsamt sein, daß nicht mehr zwischen gebundenen und ungebundenen strukturspezifischen Markern unterschieden werden kann.

Die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen können mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden und/ oder Lipiden stabilisiert sein.

Die Partikelgrößen der ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen liegen vorteilhafterweise zwischen 1 nm und 1000 nm. Insbesondere bevorzugt sind Partikelgrößen zwischen 2 nm und 500 nm.

Verfahrensgemäß erfolgt der Nachweis der Bindungsremanenz mit hierfür geeigneten Meßanordnungen, wobei die Aufmagnetisierung zunächst mittels eines geeigneten Magnetfeldes durchgeführt wird und anschließend die Messung der Remanenz der magnetisierten strukturspezifischen Substanz oder davon abhängiger Signale durch geeignete empfindliche Magnetfeldsensoren, wie zum Beispiel Superconducting Quantum Interference Device (SQUID), nach Abschalten des Feldes erfolgt. Während der Messung wird die Probe vorteilhafterweise bewegt. Insbesondere vorteilhaft ist eine Modulation des Signals durch Vibration oder Rotation der Probe. Damit wird eine Transformation des dc-Meßsignals in einen höheren Frequenzbereich realisiert. Zur Messung können in diesem Fall auch Induktionsspulen eingesetzt werden.

Vorteilhafterweise werden als Sensoren mehrere Induktionsspulen als Gradiometer verschaltet.

Die für die Beispiele verwendete Meßanordnung ist in Fig. 1 dargestellt.

Im Gegensatz zu bereits bekannten Methoden (JP-235774 und WO 91/15243) wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht die statische Magnetisierung, sondern in Abwesenheit eines äußeren magnetisierenden Feldes die Bindungsremanenz oder davon abhängige Signale gemessen. Erst dadurch werden Informationen über den Bindungszustand der Marker zugänglich.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie einzuschränken.

Ausführungsbeispiel 1

100 µg eines monoklonalen Antikörpers gegen Collagen III; im folgenden Anti-Collagen III genannt, werden in 500 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. 1 ml dextranecoate Magnetitsuspension mit 1 Mol Fe/l und einer Teilchengröße von ca. 40 nm (hydrodynamischer Durchmesser) wird über eine Sephadex® Säule (Pharmacia PD 10) mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat umgepuffert. Zu der Suspension werden 0,5 ml 10 mmol Natriumperiodat-Lösung gegeben. Die Lösung wird 2 Stunden im Dunkeln stengelassen. Anschließend wird über eine PD 10 mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung eluiert. Zu der Suspension wird die Anti-Collagen III-Lösung gegeben. Die Mischung wird 3 Stunden bei 4°C im Dunkeln stengelassen. Anschließend werden 5 mg NaBH₄ als Festsubstanz zugegeben und kurz geschwenkt. Die Mischung wird 8 Stunden bei 4°C im Dunkeln stengelassen. Anschließend werden die magnetitmarkierten Anti-Collagen III (im folgenden Mag-Anti-Collagen III genannt) über eine PD 10 Säule mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) eluiert.

Eine Lösung von 5 µg Collagen III in 200 µl Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) wird in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit phosphatgepufferte Kochsalzlösung, enthaltend 0,1 % Tween 20 (PBST), gespült. In der Probe werden 5 µl Mag-Anti-Collagen III in 200 µl PBST gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 10 mT 4 cm unterhalb des Squid-Detektors magnetisiert (s. Fig. 1). Nach Abschalten des Magnetfeldes wird die Probe vermessen. Dazu wird die Probe während der Messung aus der Magnetisierungsspule entfernt. Bei der Probe wird eine Remanenz festgestellt.

Ausführungsbeispiel 2

Eine Lösung von 5 µg Collagen V in 200 µl PBS-Puffer pH 7,4 wird in einem Probengefäß aus Polystyrol inkubiert. Anschließend wird die Flüssigphase verworfen. Das Probengefäß wird dreimal mit PBST Waschpuffer pH 7,4 gespült.

Zu der Probe werden 5 µl Mag-Anti-Collagen III, hergestellt nach Beispiel 1, in 200 µl PBST gegeben. Es wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe in einer magnetisch abgeschirmten Kammer in einem Feld der Stärke 10 mT 4 cm unterhalb des SQUID-Detektors magnetisiert (s. Fig. 1). Nach Abschalten des Magnetisierungsfeldes wird die Probe vermessen. Dazu wird die Probe während der Messung aus der Magnetisierungsspule entfernt. Bei der Collagen V enthaltenden Probe ist keine Remanenz feststellbar.

Ausführungsbeispiel 3

Aus 10 ml einer 1,9 mg/ml Collagen III-Lösung in PBS (pH 7,4) werden jeweils 5 ml der folgenden Verdünnungen hergestellt:

1000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml

Von jeder Verdünnung werden je 3mal 1 ml in Polystyrolröhrchen (Fassungsvolumen 2,5 ml) pipettiert. Es wird 1 Stunde bei 37°C inhibiert. Danach wird der Inhalt der Röhrchen verworfen. Die Röhrchen werden 3mal mit je 1 ml PBST gewaschen.

In jedes Röhrchen werden 1 ml einer 1 : 100-Verdünnung des Magnetit markierten Antikörpers, hergestellt gemäß Beispiel 1, gegeben. Die Röhrchen werden 1 Stunde bei Raumtemperatur stengelassen. Danach werden die Proben mit der in Fig. 1 skizzierten Meßanordnung magnetisiert (10 mT) und nach Abschalten des magnetisierenden Feldes werden die Proben vermessen. Dazu werden die Proben während der Messung aus der Magnetisierungsspule entfernt. Die Auswertung der gemessenen Signale ist ein Maß für die Bindungsremanenz und ergibt den in Fig. 2 wiedergegebenen Zusammenhang.

B Beschreibung der Abbildung n

Fig. 1 zeigt die Meßanordnung für die Messung der Bindungsremanenz.

Fig. 2 zeigt die in Ausführungsbeispiel 3 festgestellten konzentrationsabhängigen Bindungsremanenzen.

Darin bedeutet concentration = Konzentration

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen, dadurch gekennzeichnet, daß strukturspezifische Substanzen zunächst
 - i) mit freibeweglichen ferrimagnetischen oder ferromagnetischen kolloidalen Teilchen geeigneter magnetischer Koerzitivfeldstärke und geeignetem magnetischem Moments markiert werden und anschließend
 - ii) diese markierten strukturspezifischen Substanzen in einer zu vermessenden flüssigen oder immobilisierten Probe eingesetzt werden, die zu vermessende Probe mittels eines von außen angelegten Magnetfeldes geeigneter Stärke aufmagnetisiert wird und nach Abschalten des äußeren Feldes die Remanenz der Magnetisierung der kolloidalen Teilchen mittels geeigneter Magnetfeldsensoren vermessen wird, wobei die durch spezifische Bindung auftretende Remanenz und deren Ausmaß zur Analyse herangezogen wird.

2. Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die durch spezifische Bindung verursachte Remanenz von stabilen oder quasistabilen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Partikeln, die zum Zwecke der Verleihung einer Spezifität mit strukturspezifischen Substanzen kombiniert sind, bestimmt wird, während die Magnetisierung von gleichzeitig in der Probe vorhandenen weiteren ungebundenen stabilen oder quasistabilen ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Partikeln, die ebenfalls zum Zwecke der Verleihung einer Spezifität mit strukturspezifischen Substanzen kombiniert sind, vor Beginn der Messung schon durch extrinsischen Superparamagnetismus abgeklungen ist.

3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipoproteine sind.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die an Rezeptoren bindenden Agonisten Zytokine, Lymphokine oder Endotheline sind.
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen eine Bindungskonstante im Bereich von $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$ haben.
7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe während der Messung bewegt und damit das Probensignal aufgrund der Bindungsremanenz moduliert wird.
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren als Gradiometer geschaltete Induktionsspulen eingesetzt werden.
9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Magnetfeldsensoren SQUIDs eingesetzt werden.
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine direkte simultane Bestimmung von mehreren verschiedenen Analyten in Flüssigkeiten oder Festsubstanzen durchgeführt wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß für eine direkte simultane quantitative Bestimmung von Analyten unterschiedliche ferromagnetische oder ferrimagnetische Substanzen mit ausreichend diskreten Koerzitivfeldstärken verwendet werden.

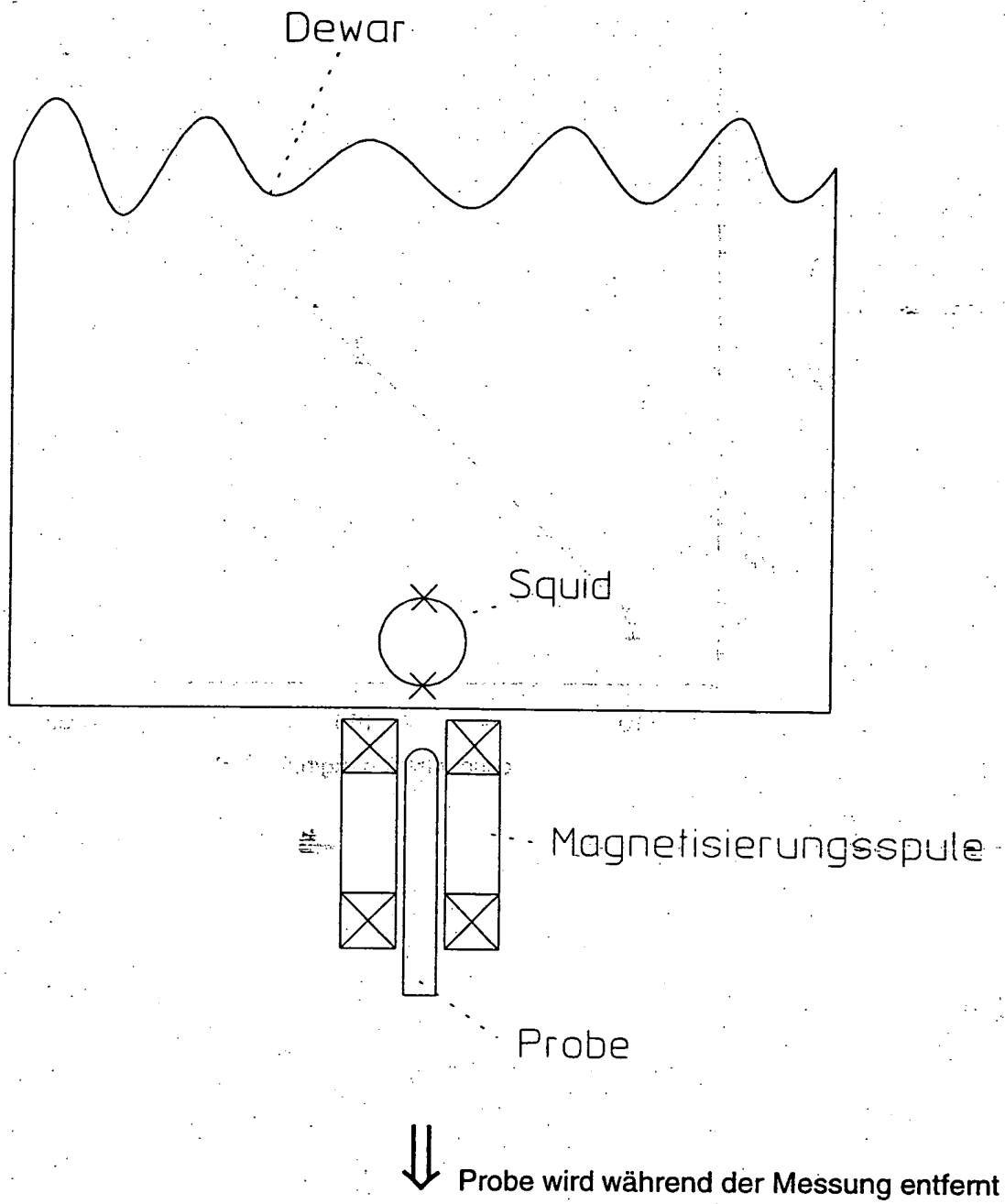
12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die intrinsische Néel-Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen größer als die Messzeit ist.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen länger als 10^{-3} Sekunden ist.
14. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Relaxationszeit der verwendeten ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen länger als 1 Sekunde ist.
15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Partikelgröße im Bereich von 1 bis 1000 nm haben.
16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen eine Partikelgröße im Bereich von 2 bis 500 nm haben.
17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen und ferrimagnetischen Substanzen mit einer Hülle aus oligomeren oder polymeren Kohlenhydraten, Proteinen, Peptiden, Nukleotiden und/ oder Lipiden stabilisiert sind.
18. Verbindungen zur Bindungsremanenzmessung, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus kolloidalen Suspensionen freibeweglicher ferrimagnetischer oder ferromagnetischer Teilchen und strukturspezifischen Substanzen bestehen.
19. Verbindungen zur Bindungsremanenzmessung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferrimagnetischen und ferromagnetischen

schen Teilchen eine Néel-Relaxationszeit aufweisen, die länger als 1 Millisekunde ist.

20. Verbindungen zur Bindungsremanenzmessung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die ferrimagnetischen und ferromagnetischen Teilchen eine Néel-Relaxationszeit aufweisen, die länger als 1 Sekunde ist.
21. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die strukturspezifischen Substanzen Antikörper, Antikörperfragmente, spezifisch an Rezeptoren bindende Agonisten oder deren Antagonisten, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Kohlenhydrate, oder Lipoproteine sind.
22. Verbindungen gemäß den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Kombinationen mehrerer ferromagnetischer oder ferrimagnetischer Teilchen mit unterschiedlichen Koerzitivfeldstärken bestehen.
23. Verwendung des Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 - 17 in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umwelt und medizinischen Diagnostik.
24. Verwendung der Verbindungen gemäß Anspruch 18 bis 22 in der Fertilität, Histokompatibilität, Allergie, Infektiologie, Hygiene, Genetik, Virologie, Bakteriologie, Toxikologie, Pathologie, Umwelt und medizinischen Diagnostik.

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur quantitativen Detektion von Analyten in Flüssig- und Festphasen mittels Bindungsremanenzmessung, dafür geeignete Verbindungen und deren Verwendung in der Analytik beschrieben.

**Fig. 1**

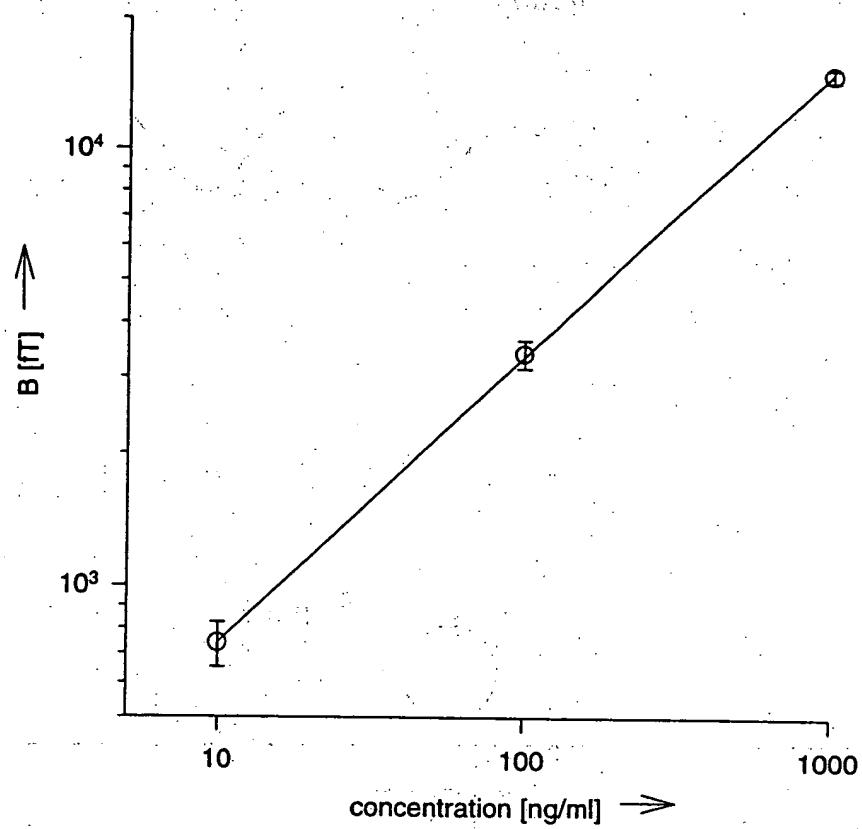


Fig. 2